

Rec'd PCT/PTO 10 DEC 2004  
PCT/EP 03/06072

Mod. C.E. - 1-4-7

08.08.2003

PCT/EP03/06072

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 04 SEP 2003  
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

MI2002 A 001260

EPO - DG 1

- 8 08. 2003

(72)

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

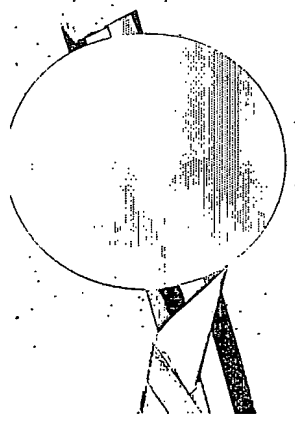


ma, li 4 LUG. 2003

IL DIRIGENTE

*Paola Di Cintio*

D.ssa Paola DI CINTIO



AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **DOX-AL ITALIA S.p.A.**  
 Residenza **CORREZZANA (MI)** codice **00729770966**  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr. ssa Gemma Gervasi ed altri** cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 denominazione studio di appartenenza **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**  
 via **C.so di Porta Vittoria** n. **9** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) **A23L** gruppo/sottogruppo **1/015**

**Nuovo processo industriale di decontaminazione di liquidi alimentari da contami-**  
**nanti chimici e/o biologici**

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

E. INVENTORI DESIGNATI

1) **VOLFATO Ivo** cognome nome SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_  
 2) **BIZZINI Bernard** 3) **VENERONI Flavio** cognome nome  
 4) \_\_\_\_\_

F. PRIORITÀ

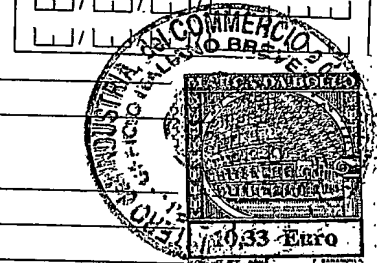
nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) <b>nessuna</b>				
2)				

SCIOGLIMENTO RISERVE  
 Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**nessuna**



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	n. pag.	PROV	n. tav.	DESCRIZIONE
Doc. 1) <b>12</b>	<input checked="" type="checkbox"/>	<b>45</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....
Doc. 2) <b>10</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....
Doc. 3) <b>10</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale .....
Doc. 4) <b>10</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		designazione inventore .....
Doc. 5) <b>10</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		documenti di priorità con traduzione in italiano .....
Doc. 6) <b>10</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		autorizzazione o atto di cessione .....
Doc. 7) <b>10</b>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>		nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE  
 Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_  
 confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale Euro **DUECENTONOVANUNO/80.-**

COMPILATO IL **07/06/2002**

CONTINUA SI/NO **NO**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Gemma Gervasi**

obbligatorio

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO** **MILANO**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **MI2002A 001263**

Reg. A.

L'anno **DUEMILADUE**

il giorno **DIECI**

del mese di **GIUGNO**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di n. **09** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

II. RAPPRESENTANTE PUR INFORMATO DEL CONTENUTO

**DELLA CIRCOLARE N.423 DEL 22/03/01**

**EFFETTUA IL DEPOSITO CON RISERVA**

**DI LETTERA DI INCARICO.**

IL DEPOSITANTE

*Gemma Gervasi*

timbro

UFFICIALE ROGANTE

M. L. ROBERTI

NUMERO DOMANDA LMT2002A 00

**REG. A**

DATA DI DEPOSITO 10/05/2002

NUMERO BREVETTO 9 \_\_\_\_\_

DATA DI RILASCIO 11/11/11

**D. TITOLO**

Nuovo processo industriale di decontaminazione di liquidi alimentari da contaminanti chimici e/o biologici

## L RIASSUNTO

Procedimento per la decontaminazione di un liquido alimentare da uno o più contaminanti chimici e/o biologici comprendente il contatto di detto liquido con almeno una membrana di materiale biocompatibile alla cui superficie sono legati covalentemente anticorpi specifici per detti contaminanti.



## M. DISEGNO

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo :

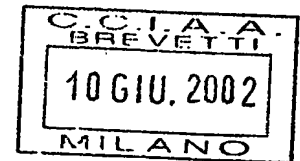
" Nuovo processo industriale di decontaminazione di liquidi alimentari da contaminanti chimici e/o biologici"

a nome di: DOX-AL ITALIA S.p.A.

con sede in: CORREZZANA (MI)

Inventori designati: VOLPATO Ivo, BIZZINI Bernard, VENERONI Flavio

MI 2002 A 0 0 1 2 6 0



\* \* \* \* \*

### STATO DELL'ARTE

I liquidi alimentari, ad esempio vino, latte, succhi di frutta e di verdura, birra, acque possono contenere contaminanti di natura chimica o biologica.

Tra i contaminanti chimici quelli più spesso riscontrati sono ad esempio:

- antiparassitari, diserbanti, pesticidi: possono giungere all'alimento in quanto trasferiti direttamente dal terreno al frutto o al vegetale utilizzato come prodotto di partenza per la produzione del liquido o, nel caso del latte, all'alimento utilizzato per l'animale produttore.
- farmaci, ormoni e loro metaboliti: trovano origine, nel ciclo produttivo del latte, dal trattamento non controllato dell'animale oppure, come nel caso degli ormoni, dal periodo di mungitura
- di processo: possono formarsi, ad esempio, in seguito alla fermentazione malolattica del vino.

I contaminanti biologici più frequenti sono le tossine, ad esempio di origine batterica o micotica, le quali possono giungere all'alimento dal frutto o dal vegetale utilizzato come prodotto di partenza oppure possono generarsi durante il processo di preparazione del liquido alimentare.

L'entità delle possibili contaminazioni e la difficoltà della gestione e controllo degli eventi alla loro origine rende il problema della contaminazione di alimenti liquidi di notevole attualità per l'importanza che riveste nella gestione dei fattori di rischio per il consumatore.

E' nota, ad esempio, la nefrotossicità delle tossine micotiche (I. Baudrimont, A.M. Betbeder, A. Gharbi, A. Pfohl-Leszkowicz, G. Dirheimer and E.E. Creppy, Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by administration of ochratoxin A in rats, Toxicology, 1994, 89(2), 101), come sono, altresì noti i problemi derivanti dalla farmacoresistenza conseguente ad un uso non controllato di antibiotici e gli effetti (in particolare sulle popolazioni a rischio) della presenza negli alimenti di metaboliti farmacologicamente attivi quali, ad esempio, glucocorticoidi ed amine biogene.

E' quindi fortemente sentita l'esigenza di avere a disposizione tecniche che permettano la completa decontaminazione dei liquidi edibili da tutti i suddetti contaminanti.

Fino ad oggi, tale decontaminazione è stata condotta con tecniche che sfruttano l'adsorbimento fisico di queste sostanze su substrati inerti quali il carbone attivo, il gel, la cellulosa e loro derivati. Tuttavia, l'impiego di tali tecniche è stato fortemente limitato sia dal fatto che non permettono di ottenere un sufficiente effetto decontaminante sia dal fatto che, utilizzando dei processi fisici aspecifici, portano alla rimozione dal liquido anche di sostanze, ad esempio pigmenti, aromi o addirittura sostanze nutrizionali, importanti nel determinare le caratteristiche primarie

dell'alimento stesso.

Nella domanda di brevetto MI99A002622, a nome della titolare, è stata descritta una tecnica di decontaminazione di liquidi totalmente innovativa e migliorativa che prevede la complessazione di contaminanti tossici presenti nel liquido alimentare con il corrispondente anticorpo policlonale specifico insolubilizzato.

In particolare, immunoglobuline specifiche per il contaminante che si desidera eliminare vengono insolubilizzate per adesione a palline di vetro o di plastica o palline metalliche magnetizzate, opzionalmente ricoperte di polimeri chimicamente derivatizzabili e aggiunte al liquido contaminato, in precisi e predeterminati rapporti di concentrazione molare. Dopo incubazione i complessi residui tossici-immunoglobuline formati vengono eliminati per filtrazione.

L'applicazione industriale di questa tecnica ha messo però in evidenza alcune limitazioni:

- a. l'impiego di palline, come mezzo di immobilizzazione ed utilizzo dei decontaminanti comporta, a causa della loro precipitabilità, la necessità di una consistente agitazione dell'alimento liquido che comporta dei notevoli costi di modifica del processo e che, tra l'altro, non è sempre tecnicamente applicabile.
- b. la limitata superficie di contatto tra immunoglobuline e liquido da decontaminare fanno sì che i tempi di decontaminazione siano relativamente lunghi e non sempre compatibili con il processo produttivo.
- c. poichè l'anticorpo è legato al supporto solido per adesione, quindi

attraverso un legame debole, durante le fasi di lavaggio e riattivazione per l'impiego in processi successivi, questo tende a distaccarsi dal supporto in quantità significative non consentendo quindi il riutilizzo per un numero sufficiente di volte tale da non rappresentare una significativa incidenza sui costi di produzione.

d. La necessità di filtrazione del liquido alla fine del procedimento porta ad aumento dei tempi e dei costi di produzione.

Substrati di diversa natura, ad esempio membrane di nitrocellulosa o altri polimeri fisicamente reattivi, a cui sono legate per adesione le immunoglobuline sono noti e vengono in particolare utilizzati in biochimica clinica a scopi diagnostici.

Recentemente sono stati inoltre utilizzati anche, ad esempio, per la rilevazione di micotossine negli alimenti e liquidi biologici; citiamo, ad esempio:

- E. Usleber, E. Schneider and G. Terplan, Direct enzyme immunoassay in microtitration plate and test strip format for the detection of saxitoxin in shellfish, Lett. in Appl. Microbiol., 1991, 13, 275.

- S. De Saeger and C. Van Peteghem, Dipstick Enzyme Immunoassay to Detect Fusarium T-2 Toxin in Weath, Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(6), 1880.

-E. Usleber, E. Schneider, G. Terplan and M.V. Laycock, Two formats of enzyme immunoassay for the detection of saxitoxin and other paralytic shellfish poisoning toxins, Food Additiv. and Contaminants, 1995, 12(3), 405.



## SOMMARIO DELL'INVENZIONE

E' stato ora sorprendentemente trovato che membrane di materiale biocompatibile, preferibilmente di natura polimerica, alla cui superficie sono legati covalentemente anticorpi specifici per sostanze contaminanti possono essere vantaggiosamente utilizzate per la decontaminazione di liquidi alimentari, permettendo di superare i problemi incontrati con le tecniche di decontaminazione dell'arte nota ed portando a risultati sorprendenti in termini sia di efficacia che di semplicità di applicazione.

Pertanto, la presente invenzione si riferisce ad un nuovo procedimento di decontaminazione di liquidi alimentari in cui vengono utilizzate le suddette membrane.

## DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Oggetto della presente invenzione è un procedimento per la decontaminazione di un liquido alimentare da uno o più contaminanti chimici e/o biologici comprendente il contatto di detto liquido con almeno una membrana di materiale biocompatibile alla cui superficie sono legati covalentemente anticorpi specifici per detti contaminanti.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è una membrana per la decontaminazione di liquidi alimentari da contaminanti chimici e/o biologici, da utilizzarsi nel procedimento dell'invenzione, caratterizzata dal fatto di essere costituita di materiale biocompatibile e di presentare legati covalentemente alla sua superficie anticorpi specifici per detti contaminanti

Secondo una applicazione particolarmente preferita, il procedimento dell'invenzione prevede l'immersione nel liquido da decontaminare



della/delle membrane dell'invenzione, preferibilmente in forma di strisce, le quali sono mantenute in distensione nel liquido grazie alla presenza ad una estremità di dei galleggianti, ad esempio delle palline di plastica vuote, e all'estremità opposta di dei contrappesi. Le membrane vengono mantenute in immersione nel liquido da decontaminare per un periodo di tempo compreso preferibilmente tra 1 e 24 ore, a seconda della concentrazione dell'agente contaminante, dalla temperatura e della presenza o meno di agitazione.

La decontaminazione del liquido avviene più rapidamente in presenza di agitazione. Tuttavia, è possibile effettuare una decontaminazione completa e rapida del liquido alimentare secondo il procedimento della presente invenzione anche in assenza di agitazione. Questo è particolarmente vantaggioso nel caso in cui l'agitazione della massa di liquido da decontaminare sia sconsigliabile o richieda costi eccessivi.

La decontaminazione inoltre avviene più rapidamente quando si opera a temperatura ambiente piuttosto che a temperature inferiori a questa. Quando si opera a temperatura ambiente la decontaminazione avviene infatti preferibilmente in un tempo compreso tra 1 e 6 ore.

Al termine del trattamento, la/le membrane dell'invenzione vengono separate dal liquido per semplice rimozione consentendo quindi l'eliminazione di procedimenti di separazione, quali la filtrazione, necessari quando si utilizzano le tecniche dell'arte nota, con notevoli vantaggi in termini di costo e sicurezza.

I liquidi alimentari che possono essere decontaminati con il procedimento della presente invenzione sono, ad esempio, vino, latte,

succhi di frutta e di verdura, birra e acqua.

Secondo una applicazione particolarmente preferita la/le membrane utilizzate nel procedimento dell'invenzione sono costituite di un polimero biocompatibile adatto ad essere coniugato chimicamente ad anticorpi, preferibilmente in forma di tessuto o tessuto-non-tessuto.

Preferibilmente il suddetto polimero è un polimero sintetico o semisintetico adatto alla preparazione di una membrana dotata di sufficiente resistenza meccanica per essere utilizzata nel procedimento dell'invenzione.

Preferibilmente il suddetto polimero è scelto tra nylon e suoi derivati, derivati della cellulosa e poliacrilati. Tra questi polimeri particolarmente preferiti sono la nitrocellulosa ed il nylon 6,6.

Alla superficie delle membrane dell'invenzione sono immobilizzati anticorpi specifici per il/i contaminanti che si desidera eliminare. Preferibilmente detti anticorpi sono anticorpi policlonali e vengono ottenuti per immunizzazione di animali di media/grande taglia secondo metodi noti nell'arte, ad esempio attraverso il metodo descritto in A. Johnstone e R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, 1982, 27 - 30, Blackwell Sci. Publ., Oxford.

L'immobilizzazione degli anticorpi sulle membrane dell'invenzione viene eseguita utilizzando reazioni di coniugazione chimica note nell'arte, ottimizzate specificamente allo scopo.

La coniugazione chimica con l'anticorpo avviene preferibilmente attraverso un linker, il quale ha la funzione di diminuire l'ingombro sterico favorendo in tal modo sia la coniugazione dell'anticorpo alla membrana

che l'interazione tra l'anticorpo ed il/i contaminanti.

Un linker particolarmente preferito è il seguente:

$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-N=CH-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH=O}$ .

Il procedimento dell'invenzione permette di eliminare da un liquido alimentare qualsiasi contaminante verso il quale possano essere prodotti anticorpi specifici.

In particolare, i suddetti contaminanti possono essere di natura chimica, quali ad esempio antiparassitari, diserbanti, pesticidi, farmaci e loro metaboliti, ormoni e loro metaboliti e sostanze indesiderate che si originano durante di processo di produzione dell'alimento liquido, oppure di natura biologica, ad esempio tossine.

In particolare, come verrà descritto in dettaglio nella parte sperimentale che segue, il procedimento dell'invenzione si è dimostrato molto efficace nell'eliminare dai liquidi alimentari i seguenti contaminanti:

atrazina, aflatossina, ocratossina, fumonisina, cadaverina, putresceina, uretano, progesterone e Salmonella inattivata.

Il procedimento secondo la presente invenzione permette di decontaminare un liquido da più contaminanti in un'unica operazione, utilizzando membrane a cui sono legati anticorpi diretti verso i diversi contaminanti.

Nel procedimento di decontaminazione secondo l'invenzione vengono pertanto utilizzate una o più membrane per ogni contaminante presente.

La superficie totale della/delle membrane utilizzate per ciascun contaminante è tale che il rapporto molare tra l'anticorpo immobilizzato ed il contaminante verso cui l'anticorpo è diretto è preferibilmente  $\geq 1$ .



Secondo una applicazione particolarmente preferita tale rapporto è compreso tra 1 e 5 e preferibilmente tra 1 e 2.

Il procedimento dell'invenzione presenta numerosi ed inaspettati vantaggi rispetto alla tecniche note per la decontaminazione di liquidi alimentari.

In particolare, come verrà dimostrato negli esempi che seguono, il procedimento dell'invenzione è di più facile applicazione, non richiedendo agitazione del liquido, e permette di ottenere una decontaminazione completa in tempi estremamente più brevi rispetto al procedimento descritto nella domanda di brevetto MI99A002622, che utilizza per la decontaminazione anticorpi immobilizzati su palline. Inoltre, come si vede dall'Esempio 18, un ulteriore vantaggio del presente procedimento è il fatto che le membrane dell'invenzione possono essere rigenerate per distacco del contaminante tramite lavaggio, ad esempio, con HCl 0.1 N e riutilizzate per successivi procedimenti di decontaminazione, senza perdita della loro attività decontaminante, con notevoli vantaggi in termini di costo del processo di decontaminazione.

#### ESEMPIO 1

##### Preparazione del coniugato Atrazina-BSA

##### 1. Preparazione del diazoderivato.

A 10 mg di atrazina ( $4.6 \times 10^{-6}$  moli) si sono aggiunti 10  $\mu$ l di HCL 1N ( $5 \times 10^{-6}$  moli). Il prodotto è stato bene imbevuto con una spatola e quindi la provetta contenente la miscela è stata posta in acqua bollente e si sono aggiunti 900  $\mu$ l di acqua distillata. La risultante soluzione di atrazina•HCl

è stata addizionata di 0.5 ml di HCl 1 N e poi raffreddata in bagno di ghiaccio. Dopo aggiunta di 1 mg di NaBr si sono aggiunti, sotto agitazione e goccia a goccia, 260  $\mu$ l di una soluzione fredda di NaNO<sub>2</sub> alla concentrazione di 1mg/ ml (260 mg,  $4.4 \times 10^{-6}$  moli). L'agitazione è stata proseguita per 1 ora in ghiaccio a dare il diazoderivato in oggetto.

## 2. Coniugazione con BSA

Ad una soluzione di BSA alla concentrazione di 8.4 mg/ml in tampone borato 0.1 M, pH 9 si è aggiunta, sotto agitazione e goccia a goccia in un periodo di 15 minuti, la soluzione del diazoderivato preparata al punto 1, mantenendo il pH costante per aggiunta, di NaOH 1N. La miscela è stata fatta reagire per 2 ore in ghiaccio e quindi dializzata contro PBS.

## ESEMPIO 2

### Preparazione del coniugato Aflatossina-BSA

#### 1. Preparazione del bis-diazoderivato della benzidina

26 mg di benzidina  $\cdot 2\text{HCl}$  sono stati sciolti in 4.5 ml di HCl 0.2 N, poi addizionati con 18 mg di NaNO<sub>2</sub> sciolti in 0.5 ml di acqua distillata. La reazione è stata condotta in bagno di ghiaccio sotto agitazione per 1 ora, con sviluppo immediato di una colorazione arancione.

#### 2. Coniugazione con BSA

A 50  $\mu$ l di una soluzione di BSA ad una concentrazione di 10 mg/ml in tampone borato 0.16M-NaCl 1.3 M, pH=9 sono stati aggiunti 50  $\mu$ g di aflatossina liofilizzata. Alla miscela così ottenuta è stata aggiunta una miscela costituita da 17 $\mu$ l della soluzione di bis-diazo-benzidina di cui al punto 1 e 33  $\mu$ l di tampone borato. Si è sviluppata una colorazione bruna e la reazione è stata fatta proseguire per 2 ore a 4°C sotto saltuaria

agitazione. La miscela di reazione è stata quindi dializzata contro PBS.

### ESEMPIO 3:

#### Preparazione del coniugato Ocratossina-BSA

A 30 ml di una soluzione di BSA ad una concentrazione di 10 mg/ml in tampone acetato 0.1 M pH = 5.5 si sono aggiunti 9.32 ml di una soluzione di ocratossina ad una concentrazione di 5 mg/ml in acqua/metanolo 9/1. Alla miscela si sono aggiunti quindi 750 mg di EDAC (Sigma E 1769) e si è lasciato reagire per 2 ore a temperatura ambiente verificando il pH ogni 5 minuti nei primi 30 minuti di reazione.

Si è infine dializzato contro tampone fosfato salino (PBS - pH 7,4) su tubo avente un valore di "cut-off" di 10 KD.

Il rapporto di coniugazione BSA : ocratossina ottenuto era di 1 mmole : 25 mmoli.

### ESEMPIO 4:

#### Preparazione del coniugato Fumonisinina-BSA

##### 1. Preparazione di Fumonisinina B1-glutaraldeide-BSA

Si sono dializzati, overnight a 4 °C, 15 ml di una soluzione di BSA (sieroalbumina bovina - Sigma A 7906) contenente 1 mg/ml di proteina in tampone fosfato-salino (PBS 0,1 M pH 7,4) contro 200 ml di una soluzione di glutaraldeide (Sigma G 5882) allo 0,2%, dopodiché si è eseguita un'ulteriore dialisi della soluzione di BSA così attivata contro 500 ml di PBS (minimo tre cambi) per eliminare l'eccesso di glutaraldeide non reagita.

Alla soluzione di BSA attivata sono stati aggiunti 25 mg di fumonisinina B1 (Sigma F 1147) sciolti in 1 ml di DMSO 0,06 M e si è lasciata la reazione

avvenire per 3 ore sotto agitazione alla temperatura di laboratorio e, poi, overnight a 4 °C. La miscela è stata infine sottoposta a dialisi contro tampone PBS.

Il coniugato che si è ottenuto era costituito da 0,93 mg di BSA e 0,15 mg di fumonisina B1 per ml.

## 2. Preparazione di Fumonisina B1-CDI-BSA

Si preparano 15 ml di una soluzione di BSA (Sigma A 7906) contenente 1 mg/ml di proteina in tampone acetato 0,1 M - pH 6,5.

Si aggiungono 2,5 mg di fumonisina B1 sciolti in 1 ml dello stesso tampone contenente DMSO alla concentrazione finale 0,06 M.

Si aggiungono, sotto agitazione, 25 mg di carbodiimide (Sigma E 1769) in polvere e si continua l'agitazione per 1 ora, alla temperatura di laboratorio, verificando ogni 10 minuti il pH e riaggiustandolo a 5,5 finché necessario e lasciando quindi reagire overnight a 4 °C.

La miscela viene successivamente dializzata contro PBS per eliminare l'eccesso di reattivi che non hanno reagito.

Si ottiene un coniugato contenente 0,93 mg di BSA e 0,15 mg di fumonisina B1 per ml.

## ESEMPIO 5:

### Preparazione del coniugato Cadaverina-azo-BSA

Formula Cadaverina: 1,5-diaminopentene [  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$  ]

Formula del coniugato:  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{N}=\text{N}-\text{BSA}$

#### 1. Preparazione del mono-diazoderivato della cadaverina

La reazione è stata eseguita su bagnomaria di ghiaccio.

Si sono sciolti 35 mg di cadaverina bicloridrato (0,2 mmoli) in 5 ml di



acqua contenente 0,3 mmoli di HCl e 4 mg di NaBr (0,04 mmoli).

Si sono quindi aggiunti, sotto agitazione e lentamente in un tempo di circa 10 minuti, 14,5 mg (0,21 mmoli) di  $\text{NaNO}_2$  sciolti in 1 ml di acqua ghiacciata.

Dopo avere verificato la presenza di un eccesso di  $\text{HNO}_2$  con carta iodo-amidonata si è lasciato reagire per altri 10 minuti.

Si ha la formazione di:  $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{N}=\text{N}-\text{OH}]$

## 2. Preparazione del coniugato cadaverina-azo-BSA:

A 10 ml di una soluzione di BSA alla concentrazione di 10 mg/ml in tampone borato 0,1 M, pH=9,0 contenente NaCl 0.13 M si sono aggiunti, sotto agitazione ed in bagnomaria di ghiaccio, 2 ml della soluzione del diazoderivato della cadaverina preparato come sopra.

Si è lasciato reagire per 2 ore a 4 °C, con agitazione saltuaria, quindi si è dializzata la miscela, su tubo da dialisi con "cut off" di 10 KD; contro PBS. Il pH è stato, successivamente, riaggiustato a 9,0.

Il rapporto di coniugazione Cadaverina : BSA ottenuto era 23,5:1.

## ESEMPIO 6:

### Preparazione del coniugato Putresceina-azo-BSA

Utilizzando la stessa metodica descritta nell'Esempio 6 si è sintetizzato anche l'immunogeno putresceina-azo-BSA, rispettando i rapporti molari di reazione dello schema precedente (quindi moltiplicando la quantità indicata di cadaverina per 0,92).

Va comunque tenuto presente che, per analogia strutturale, gli anticorpi prodotti contro la cadaverina reagiscono anche nei confronti della putresceina in modo sufficiente per consentirne la complessazione.



## ESEMPIO 7:

Preparazione del coniugato Etile-carbamato-N=N-BSA

## 1. Diazotazione di etil-carbammato (uretano)

35,6 mg (0.4 moli) di uretano sono stati sciolti in 4 ml di HCl 0,1 N e la soluzione è stata raffreddata in ghiaccio.

Si sono quindi aggiungono 24,8 mg di NaNO<sub>2</sub> sciolti in 2 ml di acqua ghiacciata, sotto agitazione, dopodiché si è protratta l'agitazione per 1 ora sempre in bagno di ghiaccio.

## 2. Formazione del coniugato con BSA

Ad una soluzione contenente 130 mg di BSA in 13 ml di tampone borato 0,16M – NaCl 0,13M, pH=9,0 raffreddata in ghiaccio, è stato aggiunto 1 ml della soluzione dei diazo-etil-carbammato, lentamente e sotto agitazione, e si è lasciato reagire per 2 ore, dopodiché si è dializzato contro lo stesso tampone su tubo per dialisi avente "cut off" di 10 KD.

Il rapporto etilcarbammato: BSA ottenuto era 40 moli : 1mole

## ESEMPIO 8:

Preparazione del coniugato Progesterone-BSA

## 1. Attivazione del progesterone

Si sono sciolti 60 mg di progesterone-3(O-carbossimetil)ossima [0,15 mM] (Sigma P 3277) e 37,5 µl (corrispondenti a 0,15 mM) di tri-n-butilammina in 1,5 ml di diossano.

Si è quindi raffreddata la soluzione a 8°C e si sono aggiunti 20 µl (0,15 mM) di isobutilclorocarbonato lasciando reagire per 35 minuti.

## 2. Coniugazione con BSA

210 mg di BSA (bovine serum albumine -Sigma) si sono solubilizzati in

5,5 ml di acqua e si sono aggiunti 4 ml di diossano e 240 µl di soda 1 N.

Dopo avere raffreddato la miscela a 8 °C è stata aggiunta a questa tutta la soluzione di progesterone attivato, il pH è stato aggiustato a 7,5 e si è lasciato reagire per 30 minuti. Si sono quindi aggiunti altri 25 µl di NaOH 1 N e si è lasciata proseguire la reazione per 4 ½ ore.

La soluzione è stata dializzata overnight contro acqua.

Si è quindi portato il pH a 4,5 con HCl 1M; il precipitato che si è formato è stato lasciato a riposo a 4 °C, recuperato per centrifugazione, solubilizzato in 10 ml di acqua, aggiustando il pH a 7,0 con soda 1 M ed infine, purificato per successivi passaggi su acetone (15 ml per passaggio) a pH acido.

#### ESEMPIO 9:

##### Inattivazione della Salmonella

Per la produzione di anticorpi anti-salmonella l'animale è stato sensibilizzato impiegando direttamente il relativo antigene.

L'antigene è stato prodotto da ceppo di *S. enteritidis* patogeno prelevato da materiale patologico-clinico e cresciuto, per via fermentativa, su terreno specifico per salmonelle.

L'estrazione dell'antigene è stata eseguita per lisi batterica utilizzando metodi noti (M. Raynaud, A. Turpin, R. Mangalo and B. Bizzini, Croissance et toxinogénèse, Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88,24).

Anche la purificazione e la trasformazione in immunogeno è stata eseguita secondo i metodi tradizionalmente in uso (B. Bizzini, A. Turpin and M. Raynaud, Bull. Inst. Pasteur, 1974, 72, 177).

## ESEMPIO 10:

Immunizzazione degli animali per la produzione di anticorpi policlonali

Gli anticorpi policlonali, relativi ai diversi immunogeni sintetizzati negli Esempi 1-9, sono stati prodotti nella pecora secondo il metodo descritto in A. Johnstone e R. Thorpe, *Immunochemistry in Practice*, 1982, 27 - 30, Blackwell Sci. Publ., Oxford.

In particolare, è stato utilizzato il seguente protocollo di immunizzazione:

a. trattamento di sensibilizzazione dell'animale per somministrazione sottocutanea (s.c.) di 10 mg di immunogeno, per animale, sospesi in 2 ml di una miscela 1 : 1 (v/v) di tampone fosfato salino (PBS) pH=7,4 e di adiuvante completo di Freund (Sigma F 5881); l'iniezione sottocutanea è stata eseguita in cinque siti diversi (0,4 ml/ sito) della zona dorsale dell'animale.

b. trattamento di richiamo fatto per somministrazione intramuscolare (i.m.) a livello della coscia, di 2,5 mg di immunogeno per animale, sospesi in 1 ml di una miscela 1 : 1 (v/v) di tampone fosfato salino (PBS) pH=7,4 e di adiuvante incompleto di Freund (Sigma F 5506).

c. somministrazioni di richiamo ogni trenta giorni, eseguite nelle stesse condizioni sperimentali sopra descritte fino a positività della risposta anticorpale.

La positività della risposta anticorpale è stata saggiata con metodo ELISA dove al pozzetto della micropiastra era adeso un immunogeno di controllo; ovvero sia un immunogeno dello stesso aptene coniugato a una proteina eterologa (es. HSA; OVA) rispetto a quella utilizzata per la sintesi dell'immunogeno di lavoro (prodotto somministrato). La sensibilità



e specificità degli anticorpi prodotti è stata analizzata con impiego di un anticorpo anti-anticorpo di pecora coniugato all'enzima HRP (Horseradish Peroxidase -Sigma A 3415).

d. il sangue, per la purificazione degli anticorpi, è stato prelevato dalla vena giugulare dell'animale il quindicesimo giorno successivo a ciascun richiamo.

#### ESEMPIO 11:

##### Purificazione delle immunoglobuline (IgG) specifiche

Il siero è stato raccolto per centrifugazione del sangue animale a 3.000 r.p.m. per 15 minuti e le immunoglobuline sono state precipitate da questo per trattamento con una soluzione satura di solfato di ammonio secondo quanto descritto in bibliografia (K. Heide and H.G. Schwick, Salt fractionation of immunoglobulins, in Immunochemistry, vol. 1, 1978, cap. 7, Ed. D.M. Weir, Blackwell Sci. Publ., Oxford).

L'eccesso di sali è stato successivamente eliminato per dialisi contro tampone fosfato salino (PBS) pH 7,4 utilizzando un tubo da dialisi avente valore di "cut-off" di 10 KD.

Le IgG specifiche per l'aptene (antigene) vengono separate dalle immunoglobuline totali per cromatografia di affinità su Sepharose 4B attivato con l'immunogeno specifico, secondo le metodologie descritte in bibliografia (S. Fuchs and M. Sela, Immunoabsorbents, in Immunochemistry, vol. 1, 1978, cap. 10, Ed. D.M. Weir, Blackwell Sci. Publ., Oxford).

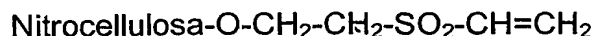
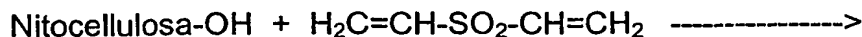
#### ESEMPIO 12:

##### Immobilizzazione di IgG specifiche su substrato (foglio) di nitrocellulosa



### 1. Attivazione della nitrocellulosa

Schema di reazione:



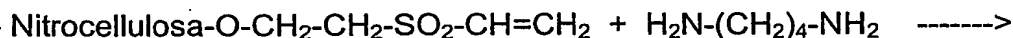
10 ml di divinilsulfone (DVS - Sigma V 3700) sono stati sciolti in 20 ml di dimetilformamide e 170 ml di tampone  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,5 M – pH= 10. In questa soluzione è stato immerso il foglio di nitrocellulosa per 10 minuti a 21 °C, che è stato poi sciacquato con acqua distillata ed asciugato.

Si è osservato che il foglio di nitrocellulosa così trattato poteva essere conservato allo stato secco a 4 °C per almeno un mese.

### 2. Attacco di linker alla nitrocellulosa attivata

Ha la finalità di eliminare l'ingombro sterico che impedisce l'attacco delle immunoglobuline.

Schema di reazione:



Il foglio di nitrocellulosa attivata preparato come descritto più sopra è stato immerso in una soluzione acquosa all' 1% (p/v) di 1,4-diamminobutano (Sigma P 7505) per 30 minuti a 21°C e, successivamente, rimosso e lavato con acqua distillata.

### 3. Legame delle immunoglobuline alla cellulosa

Le immunoglobuline sono state legate alla nitrocellulosa così trattata mediante due possibili tecniche alternative:

3a) Ossidazione periodica delle IgG e legame al gruppo  $\text{NH}_2$  del linker

10 ml di soluzione di IgG (20 mg/ml) in tampone acido citrico/citrato di Na 0,1 M - pH 5,0 sono stati riscaldati a 37 °C e si è quindi aggiunta una soluzione di sodio metaperiodato ( $\text{NaIO}_4$ , 30 mg/ml in acqua) nel rapporto molare IgG: sodio metaperiodato di 1:15.

Si è lasciata avvenire l'ossidazione per 5 min. a 37 °C sotto agitazione ed al riparo dalla luce, dopodiché la reazione di ossidazione è stata bloccata per aggiunta di etilenglicole (Sigma E 9129) alla concentrazione finale 0,01 M.

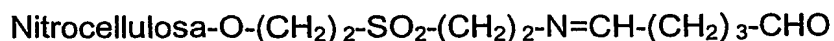
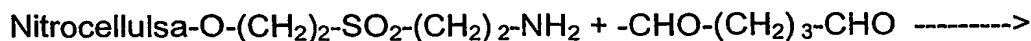
Il foglio di nitrocellulosa lincata, preparato come descritto al punto 2, è stato quindi immerso in 40 ml di tampone  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  /  $\text{NaHCO}_3$  - 1 M - pH 10,0, si è aggiunta la soluzione di IgG ossidate e si è lasciato reagire overnight a 4 °C.

Si è aggiustato, quindi, il pH a 6,0 per aggiunta di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  - 1 M e, successivamente si è aggiunta una soluzione fresca di  $\text{NaBH}_4$  - 0,26 M (10 mg/ml) fino ad una concentrazione finale 0,001 M lasciando avvenire la reazione di riduzione per 30 minuti a temperatura ambiente.

Il foglio di nitrocellulosa è stato successivamente lavato con tampone fosfato salino (PBS) - pH 7,4 ed asciugato.

3b) Introduzione di gruppi aldeidici nella nitrocellulosa lincata ed immobilizzazione delle IgG

Schema di reazione:



Il foglio di nitrocellulosa- $\text{NH}_2$ , preparato come descritto al punto 2, è stato immerso in una soluzione di glutaraldeide all'1% (v/v) in  $\text{NaHCO}_3$  /

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 0,5 M - pH 10, per 15 min. a 21 °C e quindi lavato con acqua distillata ed asciugato.

Si è osservato che il foglio di nitrocellulosa così attivato poteva essere conservato per un mese allo stato secco a 4 °C senza perdita di reattività.

Il foglio di nitrocellulosa-CHO è stato immerso in 100 ml di una soluzione di IgG in tampone  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M, pH=10,0 e lasciato a contatto overnight a 4 °C.

Il foglio è stato quindi sciacquato in tampone fosfato salino (PBS - pH 7,4) ed immerso in una soluzione fresca di  $\text{NaBH}_4$  0.001M in PBS pH 6,0 lasciando avvenire la reazione di riduzione per 30 min. alla temperatura di laboratorio prima di sciacquare il foglio in tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4).

#### ESEMPIO 13:

##### Immobilizzazione di IgG specifiche su un substrato (tessuto) di nylon

- Schema n° 1

#### 1. Attivazione del nylon

Un tessuto Nylon 6/6 [Poly(N.N'-esametilenadipindiamide) - Fluka 74712] è stato mantenuto immerso, per 24 ore, in HCl 3,5 M e quindi lavato con acqua distillata.

Si è ottenuta l'attivazione del nylon con esposizione reattiva di gruppi - $\text{NH}_2$  e - $\text{COOH}$

#### 2. Coniugazione con immunoglobuline

Le immunoglobuline sono state coniugate al nylon pretrattato con HCl seguendo tre diverse metodiche:



2a)

Schema di reazione:



I gruppi  $-\text{NH}_2$  sono stati bloccati per trattamento con anidride acetica concentrata per 1 minuto, si è proceduto quindi al lavaggio prima con acqua distillata poi con tampone carbonato 0,1 M - pH 9,5 ed infine al risciacquo in tampone fosfato salino (PBS).

I gruppi  $-\text{COOH}$  sono stati poi attivati per trattamento del materiale, così pretrattato, con 1-cicloesil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimide meta-p-toluensulfonato (CMC) al 4% in acqua, per 10 min. a temperatura ambiente.

Si sono lasciate quindi reagire le IgG con il nylon-CMC in tampone fosfato salino (PBS) per 2 ore a temperatura ambiente e poi overnight a  $4^\circ\text{C}$ .

Il tessuto è stato quindi lavato con PBS, trattato con una soluzione al 2% (p/v) di OVA in PBS a temperatura ambiente, sottoposto ad un ulteriore lavaggio con PBS - Tween 20 allo 0,05% ed infine asciugato.

2b)

Schema di reazione:



Il tessuto di nylon preattivato con HCl è stato trattato con una soluzione di glutaraldeide al 2% in acqua distillata, per 2 ore a temperatura ambiente.

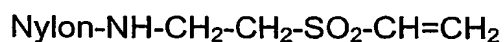
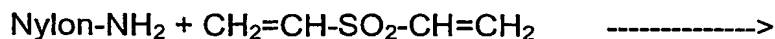
Dopo lavaggio con acqua distillata, il tessuto di nylon è stato trattato, a temperatura ambiente per 4 ore, con una soluzione di IgG in tampone



fosfato salino (PBS) alla concentrazione 1 mg/ml. Il tessuto è stato quindi lavato con PBS e trattato per 1 ora con una soluzione al 2% (p/v) di OVA (ovoalbumina) in PBS, poi di nuovo lavato a temperatura ambiente con PBS contenente Tween 20 allo 0,05% e infine asciugato.

2c)

Schema di reazione:



Il tessuto di nylon pretrattato con HCl per l'esposizione dei gruppi reattivi, è stato immerso in 10 ml di divinilsulfone (DVS) sciolti in 20 ml di dimetilformamide (DMF) e 170 ml di tampone  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$  - 0,5 M, pH 9,0 - e mantenuto in questa soluzione per 1 ora a 21 °C.

Successivamente il nylon è stato lavato con acqua distillata.

100 mg di IgG sono stati sciolti in 20 ml di tampone  $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$  - 0,5 M, pH 9,0 e si è immerso nella soluzione il tessuto di nylon-DVS mantenendolo overnight alla temperatura ambiente.

Dopo reazione, il nylon è stato sciacquato con PBS e quindi asciugato.

#### ESEMPIO 14

##### Processo di decontaminazione del vino da ocratossina

L'esperimento è stato condotto analizzando in parallelo la capacità e velocità di complessazione (eliminazione) della tossina presente nel vino da parte di immunoglobuline (IgG) anti-ocratossina specifiche utilizzate nella seguente forma:

- libere - tal quali, non legate ad alcun supporto,
- legate a palline di vetro contenenti gruppi aminici primari (Glass-

aminopropyl -Sigma G 4643 - 200/400 mesh)

c. legate a tessuto di nylon secondo la presente invenzione.

Il legame delle immunoglobuline IgG alle palline di vetro è stato eseguito utilizzando il seguente schema di reazione:

5 mg di IgG anti-ocratossina specifiche sono stati diluiti in 2 ml di tampone acetato 0,1 M – pH=5,5 e quindi dializzati contro lo stesso tampone (eliminazione di sali di purificazione).

La soluzione è stata quindi posta in bagnomaria di ghiaccio e si sono aggiunti 53,5 mg di  $\text{NaIO}_4$  lasciando reagire per 20 minuti sotto agitazione ed al riparo dalla luce.

Si sono poi aggiunti 40  $\mu\text{l}$  di etilenglicol e si è lasciato reagire per 5 min.; si è poi eseguita una dialisi contro tampone  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  /  $\text{NaHCO}_3$  - 0,1 M pH 9,5.

La soluzione è stata ripresa e riportata ad un volume di 10 ml utilizzando lo stesso tampone.

Si sono aggiunte quindi alla stessa 1 gr di palline- $\text{NH}_2$  e si è lasciato reagire overnight a temperatura ambiente.

Alla sospensione di palline si sono aggiunte quindi 800  $\mu\text{l}$  di una soluzione di  $\text{NaBH}_4$  (4 mg/ml) e si è lasciato reagire per 2 ore alla temperatura di laboratorio.

Si sono lavate le palline coniugate con IgG con tampone fosfato salino (PBS). Si è ottenuto il seguente rapporto di coniugazione:  $1,84 \times 10^{-8}$  moli di IgG / gr di palline- $\text{NH}_2$ .

La decontaminazione del vino è stata poi eseguita nelle seguenti condizioni sperimentali:

E' stato utilizzato vino rosso in quanto noto dallo stato dell'arte essere maggiormente contaminato da tossina (fino a 0,4 µg/l). Su un volume di 300 l di vino è stato trovato mediante HPLC un contenuto di ocratossina di 0,265 µg/l.

Il vino è stato quindi suddiviso in sei aliquote da 50 l che sono state così trattate:

aliquota n° 1: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-ocratossina libere nel rapporto molare 1 mole IgG : 1 mole di tossina presente.

aliquota n° 2: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-ocratossina coniugate a palline di vetro nel rapporto molare 1 mole IgG : 1 mole di tossina presente.

aliquota n° 3: sotto agitazione a 150 rpm con immersione di IgG anti-ocratossina coniugate a tessuto di nylon nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole tossina presente. Il tessuto utilizzato era in strisce dove da una parte erano saldate delle palline da ping pong per mantenerle in sospensione e dall'altra dei pesi (piombi da pesca) per mantenerle distese e comunque libere di movimento nel liquido.

aliquota n° 4 (IgG libere), n° 5 (IgG su palline di vetro) e n° 6 (IgG su tessuto di nylon) sono state trattate con le stesse modalità sopradescritte, ma portando il livello di agitazione a 1000 rpm.

Gli esperimenti di decontaminazione sono stati condotti tutti a temperatura ambiente.

Dopo 1, 3 e 6 ore di contatto, da ciascuna aliquota di vino sono stati prelevati 100 ml su cui è stato determinato il contenuto di ocratossina



ancora non sequestrata (libera).

Per la determinazione nelle aliquote n° 1 e n° 4 (con aggiunta di IgG libere) si è proceduto, prima dell'analisi, a dialisi su tubo avente "cut-off" di 100 KD per trattenere i complessi IgG-ocratossina presenti.

Nella tabella successiva sono riportati i risultati ottenuti nelle suddette condizioni sperimentali, espressi come abbattimento percentuale della concentrazione di tossina libera nel vino (capacità decontaminante dei vari sistemi di complessazione della tossina a mezzo IgG specifiche).

Metodo	Livello di agitazione	Abbattimento % tossina nel vino ai tempi:		
		1h	3h	6h
IgG libere	150 rpm	75	90	100
IgG su palline vetro	150 rpm	54	60	62
IgG su nylon	150 rpm	95	100	---
IgG libere	1000 rpm	84	95	100
IgG su palline vetro	1000 rpm	90	100	---
IgG su nylon	1000 rpm	100	---	---

I risultati ottenuti indicano che:

- è possibile, con impiego di IgG specifiche, decontaminare completamente il vino dalla presenza di ocratossina;
- l'impiego di IgG libere richiede un tempo relativamente lungo per complessare tutta la tossina (probabilmente per azione di sostanze interferenti presenti nel vino).
- l'impiego di IgG legate a palline di vetro richiede, per la complessazione totale, un livello di agitazione relativamente forte,

verosimilmente in quanto le palline in assenza o sotto leggera agitazione tendono a depositarsi nel fondo. Elevati livelli di agitazione tuttavia possono essere non compatibili con il processo industriale di vinificazione.

d. Sorprendentemente, l'impiego di IgG coniugate a tessuto è in grado di complessare la totalità della tossina presente nel vino in tempi brevi e a livelli di agitazione bassi che sono ampiamente compatibili con il processo industriale.

#### ESEMPIO 15:

##### Processo di decontaminazione del vino da amine biogene (putresceina)

L'esperimento è stato condotto per analizzare la capacità e velocità di complessazione (eliminazione) dell'amina biogena, aggiunta estemporaneamente al vino in concentrazioni prestabilite, da parte di immunoglobuline specifiche utilizzate:

- a. libere - tal quali, non legate ad alcun supporto.
- b. immobilizzate su palline di vetro (Sigma G 4663),
- c. immobilizzate su tessuto di nylon 6/6 secondo la presente invenzione, ed operando in diverse condizioni sperimentali.

L'immobilizzazione delle IgG specifiche alle palline di vetro è stata eseguita secondo la tecnica già descritta nell'esempio 14).

La valutazione del contenuto in putresceina nel vino è stata eseguita con metodo cromatografico ad alta pressione (HPLC) in gas cromatografia liquida secondo metodologie note.

E' stato utilizzato anche in questo caso vino rosso al quale, dopo analisi dell'eventuale presenza di amine biogene, è stata aggiunta, sotto

agitazione, putresceina fino a raggiungere una concentrazione finale di 4 mg/l.

Le modalità sperimentali adottate per la decontaminazione del vino sono state le seguenti:

il vino è stato suddiviso in sei aliquote da 50 l che sono state così trattate:

aliquota n° 1: mantenuta a riposo (cioè in assenza di agitazione) e con aggiunta di IgG anti-putresceina libere (non immobilizzate), nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di amina aggiunta.

aliquota n° 2: mantenuta a riposo, nelle stesse condizioni, e con aggiunta di IgG anti-putresceina immobilizzate su palline di vetro, nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di amina aggiunta.

aliquota n° 3: mantenuta a riposo, nelle stesse condizioni, e con aggiunta di IgG anti-putresceina immobilizzate su tessuto di nylon secondo la presente invenzione, nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di amina aggiunta.

Le aliquote n° 4 (con IgG libere), n° 5 (con IgG immobilizzate su palline) e n° 6 (con IgG immobilizzate su tessuto di nylon) sono state trattate con le stesse modalità, ma mantenendole per tutto il periodo della prova sotto agitazione a 150 r.p.m.

Gli esperimenti di decontaminazione sono stati condotti a temperatura ambiente.

Dopo 1, 3 e 6 ore di contatto, da ciascuna aliquota di vino sono stati prelevati 100 ml su cui si è misurato il contenuto di putresceina ancora presente nel liquido (non complessata dagli anticorpi specifici più o meno

immobilizzati).

Per la determinazione nelle aliquote n° 1 e n° 4 (trattate con IgG libere - non immobilizzate) si è dovuto procedere, prima dell'analisi, a trattamento di dialisi su tubo da 100 KD per trattenere i complessi IgG-putresceina presenti.

Nella tabella successiva sono riportati i risultati ottenuti nelle suddette condizioni sperimentali ed espressi come abbattimento percentuale della concentrazione di amina biogena libera presente nel vino (capacità decontaminante dei vari sistemi di eliminazione della amina a mezzo IgG specifiche diversamente applicate).

Aliquota	Livello di agitazione	Abbattimento % tossina ai tempi:		
		1h	3h	6h
IgG libere	No	55	65	80
IgG su palline vetro	No	50	55	58
IgG su nylon	No	75	95	100
IgG libere	150 rpm	72	87	100
IgG su palline vetro	150 rpm	65	70	74
IgG su nylon	150 rpm	96	100	-----



I risultati ottenuti indicano che:

a. sorprendentemente, utilizzando IgG immobilizzate su tessuto di nylon è possibile la completa decontaminazione di liquidi alimentari (vino) anche in condizioni di riposo; ovvero sia senza necessità di ricorso a procedimenti di agitazione che potrebbero rivelarsi particolarmente

difficoltosi da applicare nei processi produttivi.

b. viene confermato il fatto che le IgG allorché immobilizzate su palline di vetro non sono in grado di svolgere in maniera ottimale la loro funzione decontaminante in quanto in tale forma tendono a depositarsi sul fondo prima della totale complessazione.

#### ESEMPIO 16:

Processo di decontaminazione del vino da carbammati (carbammato di etile o uretano).

E' stata valutata la capacità di eliminazione dal vino di carbammato, aggiunto estemporaneamente, da parte di IgG, libere o diversamente immobilizzate su substrati inerti, a diversi livelli di concentrazione delle stesse.

A tale scopo sono state utilizzate immunoglobuline IgG antiuretano specifiche così trattate:

- a. libere - non immobilizzate ad alcun supporto,
- b. immobilizzate su palline di vetro (Sigma G 4643) come descritto negli esempi precedenti,
- c. immobilizzate su tessuto di nylon secondo la presente invenzione.

La valutazione del contenuto in carbammato di etile (uretano) è stata eseguita per via gas-cromatografica secondo il metodo descritto in bibliografia (H. M. Stahr, Analytical Methods in Toxicology, 1991, pag. 157, J. Wiley & Sons Publ. NY).

Le modalità sperimentali adottate per la decontaminazione del vino sono state le seguenti:

In un lotto di vino bianco è stata esaminata la eventuale presenza della



sostanza chimica: si sono riscontrati 5 µg/l. Si è aggiunta una ulteriore quantità di carbammato di etile fino ad una concentrazione finale di 500 µg/l.

Successivamente, il lotto di vino è stato suddiviso in quattro aliquote da 50 l che sono state così trattate:

aliquota n° 1: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-uretano libere - non immobilizzate nel rapporto molare 0,5 mole di IgG : 1 mole di sostanza chimica.

aliquota n° 2: sotto agitazione a 150 rpm con immersione, secondo le modalità già descritte negli esempi precedenti, di IgG anti-uretano immobilizzate su tessuto di nylon - nel rapporto molare 0,5 mole di IgG : 1 mole di sostanza chimica.

Le aliquote n° 3 (con IgG libere) e n° 4 (con IgG immobilizzate su tessuto di nylon) sono state trattate con le stesse modalità, ma con una concentrazione di IgG in rapporto molare 1 : 1 con la sostanza chimica.

Gli esperimenti di decontaminazione sono stati tutti condotti a temperatura ambiente.

Dopo 1, 3 e 6 ore di contatto, da ciascuna aliquota di vino sono stati prelevati 100 ml su cui si è determinato il contenuto di carbammato ancora in soluzione (non sequestrato).

Anche in questo caso le aliquote trattate con IgG libere (non immobilizzate) sono state previamente sottoposte a trattamento di dialisi per trattenere i complessi IgG-carbammato.

Nella successiva tabella sono stati riportati i risultati ottenuti nelle suddette condizioni sperimentali ed espressi come abbattimento

percentuale della concentrazione di sostanza chimica contaminante nel vino.

Metodo	Rapporto molare IgG : carbammato	Abbattimento % carbammato ai tempi:		
		1h	3h	6h
IgG libere	0.5	55	58	68
IgG su nylon	0.5	74	90	95
IgG libere	1	82	90	96
IgG su nylon	1	94	100	----

Premesso che ogni mole di anticorpo specifico è, in genere, in grado di complessare due moli di antigene, questi risultati dimostrano che l'immobilizzazione delle IgG sul tessuto di nylon rende queste sorprendentemente biodisponibili per il legame con l'antigene stesso; ciò è dimostrato dal fatto che già a concentrazioni vicine ai livelli teorici si ha la quasi totale eliminazione dell'agente contaminante dal vino.

#### ESEMPIO 17:

##### Processo di decontaminazione del latte da aflatossina

L'esperimento è stato condotto al fine di analizzare la capacità e velocità di decontaminazione del latte dalla presenza di aflatossina A1 con impiego di IgG specifiche anti-aflatossina immobilizzate su diversi supporti inerti.

La capacità decontaminante è stata quindi esaminata per:

- IgG anti-aflatossina specifiche immobilizzate su palline di vetro con il metodo già descritto negli esempi precedenti,
- Le stesse IgG immobilizzate su tessuto di nylon secondo quanto

previsto dalla presente invenzione.

Gli esperimenti di decontaminazione sono stati eseguiti mantenendo il campione alla temperatura di 4 °C, che è la temperatura di normale conservazione del latte stesso.

Le modalità sperimentali di decontaminazione adottate sono state le seguenti:

La valutazione del contenuto di aflatossina A1 nel latte è stata eseguita con metodica in HPLC secondo quanto già noto allo stato dell'arte (S.M. Lamplugh, Comparison of three methods for the extraction of aflatoxins from human serum in combination with a high-performance liquid chromatographic assay, J. Chromatogr., 1983, 273, 442) adeguando le modalità alla natura del campione:

Su un lotto di latte è stata esaminata la eventuale presenza della tossina; successivamente è stata aggiunta una quantità di aflatossina fino alla concentrazione finale di 0,3 µg/l di latte.



Successivamente si sono preparate aliquote da 10 l che sono state così trattate:

aliquota n° 1: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-aflatossina immobilizzate su palline di vetro nel rapporto molare 1 mole IgG : 1 mole di tossina presente.

aliquota n° 2: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-aflatossina immobilizzate su tessuto di nylon nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di tossina presente.

aliquota n° 3: sempre sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-aflatossina immobilizzate su palline di vetro nel rapporto molare 2

moli di IgG : 1 mole di tossina presente,

aliquota n° 4: sempre sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-aflatossina immobilizzate su tessuto di nylon nel rapporto molare 2 moli di IgG : 1 mole di tossina presente.

Si è ritenuto utile, in questo esperimento, saggiare l'effetto a livelli maggiori di concentrazione di impiego di immunoglobuline in quanto le reazioni immunologiche se condotte a freddo vengono significativamente rallentate.

Dopo 1, 3 e 6 ore di contatto, dal latte sono state prelevate aliquote di 100 ml su cui è stato determinato il contenuto di aflatossina ancora presente (non sequestrata dalle immunoglobuline).

Nella successiva tabella sono riportati i risultati ottenuti nelle suddette condizioni sperimentali, espressi come abbattimento percentuale del contenuto in tossina libera presente nel latte (capacità decontaminante dei vari sistemi di complessazione della tossina a mezzo IgG anti-tossina specifiche).

Metodo	Rapporto molare IgG : aflatossina	Abbattimento % carbammato ai tempi:		
		1h	3h	6h
IgG su palline	1:1	32	45	52
IgG su nylon	1:1	65	86	100
IgG su palline	2:1	55	78	84
IgG su nylon	2:1	80	100	----

I risultati ottenuti confermano il sorprendente miglioramento del potere

decontaminante delle immunoglobulina quando queste sono immobilizzate su nylon. rispetto ad altri sistemi di immobilizzazione. Inoltre i risultati dimostrano che anche operando a basse temperature, con tale metodo, è possibile la totale eliminazione di contaminanti dal latte.

#### ESEMPIO 18:

##### Processo di decontaminazione del latte da antigeni da Salmonella

L'esperimento è stato condotto per valutare sia la capacità di immunoglobuline specifiche immobilizzate su substrato inerte di decontaminare il latte da contaminanti batterici sia la razionalità e semplicità dei metodi di immobilizzazione per una successiva applicazione su processi industriali di produzione.

In questo esperimento è stata valutata anche l'idoneità delle IgG immobilizzate ad essere riutilizzate, dopo idoneo trattamento di ripulitura, per successivi trattamenti.

A tale scopo l'analisi della decontaminazione del latte dalla presenza di antigeni da Salmonella è stata condotta su:

- a. IgG libere - tal quali, non immobilizzate ad alcun supporto.
- b. IgG immobilizzate su palline di vetro (Sigma 4643)
- c. IgG immobilizzate su nylon secondo la presente invenzione.

Le modalità sperimentali, di decontaminazione del latte, adottate sono state le seguenti:

La valutazione della presenza di antigeni da Salmonella nel liquido alimentare è stata eseguita con metodo ELISA di tipo competitivo, con anticorpo specifico legato sulla micropiastra ed analisi della

competizione per il legame all'anticorpo tra l'antigene presente sul campione e lo stesso antigene coniugato ad un enzima di rivelazione (perossidasi).

Ad un lotto di latte sono stati aggiunti antigeni da Salmonella fino alla concentrazione finale di 20 µg/l. Successivamente lo stesso è stato diviso in aliquote da 10 l che sono state così trattate:

aliquota n° 1: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG specifiche anti-antigene da Salmonella libere - non immobilizzate - nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di antigene presente.

aliquota n° 2: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG specifiche anti-antigene immobilizzate su palline di vetro - nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di antigene presente.

aliquota n° 3: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG specifiche anti-antigene immobilizzate su tessuto di nylon - nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di antigene presente.

Gli esperimenti di decontaminazione sono stati condotti a temperatura ambiente.

Dopo tre ore di contatto le IgG sono state rimosse dal liquido secondo le seguenti metodologie:

aliquota n° 1 (IgG libere) per filtrazione su membrana a 0,45 µm;

aliquota n° 2 (IgG su palline di vetro) per filtrazione su carta da filtro Watmann 1.

aliquota n° 3 (IgG su nylon) per semplice rimozione del tessuto dal liquido.

Sul latte è stata esaminata l'eventuale presenza residua di antigene.

I risultati, espressi come abbattimento percentuale della concentrazione di antigene nel latte, (capacità decontaminante delle immunoglobuline diversamente immobilizzate) sono riportati nella successiva tabella.

Metodo	Abbattimento % antigene a 3 h
IgG libere	80
IgG su palline vetro	72
IgG su nylon	100

I risultati mettono essenzialmente in evidenza l'efficienza della decontaminazione da parte di IgG immobilizzate su tessuto di nylon, rispetto ad altri sistemi di immobilizzazione

Successivamente le palline di vetro o il tessuto di nylon sono state rigenerate per distacco del contaminante legato agli anticorpi attraverso il trattamento con una soluzione di HCl 0,1 N per 30 minuti sotto leggera agitazione. Il tessuto o le palline sono state quindi risciacquate con tampone PBS e riutilizzate per successivi processi di decontaminazione secondo le stesse modalità sopra descritte.

Gli esperimenti non sono stati condotti con IgG non immobilizzate in quanto queste sono difficilmente recuperabili.

Nella successiva tabella sono riportati i risultati, espressi come abbattimento percentuale della contaminazione del latte da antigene da Salmonella in trattamenti successivi.



Metodo	Abbattimento % antigene dopo		
	3 trattamenti	7 trattamenti	10 trattamenti
IgG su palline vetro	67	52	45
IgG su nylon	100	100	95

I risultati ottenuti dimostrano come questo tipo di immobilizzazione (su nylon) si presti, sorprendentemente, meglio rispetto ad altri per quanto riguarda il processo di rigenerazione e riutilizzo del decontaminante, il quale permette di ridurre notevolmente l'incidenza dei costi di decontaminazione sul costo prodotto.

#### ESEMPIO 19:

##### Processo di decontaminazione del latte da progesterone

L'esperimento è stato attivato per verificare l'efficacia del processo di decontaminazione di liquidi edibili, a mezzo impiego di immunoglobuline immobilizzate su supporto inerte, nei confronti di una eccessiva presenza di ormoni steroidei.

E' stato condotto nel latte in quanto alimento contenente questa tipologia di ormoni in quantità variabile a seconda il periodo fisiologico di mungitura; come esempio è stata esaminata la possibilità di rimozione dall'alimento del progesterone.

E' stato esaminato il potere decontaminante di:

- IgG anti-progesterone specifiche immobilizzate su palline magnetiche ricoperte di polimeri sintetici idonei per la coniugazione chimica.
- IgG anti-progesterone specifiche immobilizzate su strisce di nitrocellulosa secondo il procedimento della presente invenzione.

L'immobilizzazione su palline magnetiche è stata fatta utilizzando lo



stesso procedimento impiegato per l'immobilizzazione su vetro.

Le modalità sperimentali di decontaminazione del latte adottate sono state le seguenti:

La valutazione del contenuto di progesterone nel latte è stata eseguita mediante metodo immunoenzimatico ELISA utilizzando metodiche note (J.A. Demetriou, in Meth. in Clin. Chem., 1987, pag. 253, Eds. A.J. Pesce and L.A. Kaplan, C.V. Mosby C. Publ., St: Louis, USA).

Dopo controllo del contenuto in progesterone, il latte è stato suddiviso in aliquote da 10 l così trattate:

aliquota n° 1: Utilizzo di IgG immobilizzate su palline magnetizzate in concentrazione tale da avere un rapporto molare pari a 1 mole di IgG : 1 mole di progesterone presente, sotto leggera agitazione magnetica tale da mantenere le palline in movimento continuo.

aliquota n° 2: Utilizzo di IgG immobilizzate su strisce di nitrocellulosa in concentrazione tale da avere un rapporto molare pari a 1 mole di IgG : 1 mole di progesterone, sotto leggera agitazione tale da mantenere le strisce di cellulosa in leggero movimento sul liquido.

Gli esperimenti di decontaminazione sono stati condotti a temperatura ambiente.

Dopo 1 e 3 ore di contatto, da ciascuna aliquota di latte sono stati prelevati 100 ml su cui è stato determinato il contenuto di progesterone ancora presente nel liquido (non sequestrato).

Le palline sono state rimosse per filtrazione, le strisce di cellulosa per semplice prelevamento manuale.

Nella successiva tabella sono riportati i risultati ottenuti, nelle suddette

condizioni sperimentali, espressi come abbattimento percentuale della concentrazione di progesterone presente nel latte (capacità decontaminante delle IgG anti-progesterone specifiche immobilizzate su supporti inerti differenti).

Metodo	Abbattimento % progesterone ai tempi	
	1 ora	3 ore
IgG su palline magnetizzate	74	88
IgG su nitrocellulosa	97	100

I risultati evidenziano l'efficacia decontaminante di IgG coniugate a tessuti alternativi al nylon quali, ad esempio, la nitrocellulosa.

Si evidenzia inoltre che l'immobilizzazione su tessuto, operando su grossi quantitativi, è significativamente migliore e più conveniente anche di un sistema di immobilizzazione su palline magnetizzate.

#### ESEMPIO 20

##### Processo di decontaminazione di succhi di frutta da atrazina

L'esperimento è stato condotto per analizzare la capacità di IgG specifiche, immobilizzate su fase inerte, di decontaminare liquidi edibili densi quali i succhi di frutta dalla presenza di contaminanti chimici quali, ad esempio, l'atrazina.

A tale scopo le IgG anti-atrazina sono state immobilizzate su:

- palline di vetro (Sigma 4643),
- tessuto di nylon, secondo la presente invenzione.

Le modalità sperimentali di decontaminazione dei succhi di frutta adottate sono le seguenti:

La valutazione del contenuto di atrazina nei succhi è stata fatta con metodo gas-cromatografico secondo i metodi in uso comune (H.M. Stahr, Analytical Methods in Toxicology, 1991, pag. 181, J. Wiley & Sons Publ., NY).

E' stato utilizzato succo di arancia reperito dal mercato al quale si è aggiunta, in via estemporanea, una soluzione di atrazina fino ad una concentrazione finale di 50 µg/l di succo.

Lo stesso è stato quindi suddiviso in aliquote da 5 l che sono state così trattate:

aliquota n° 1: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-atrazina specifiche immobilizzate su palline di vetro, nel rapporto molare 2 moli di IgG : 1 mole di contaminante.

aliquota n° 2: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-atrazina specifiche immobilizzate su tessuto di nylon, secondo la presente invenzione, nel rapporto molare 1 mole di IgG : 1 mole di contaminante.

aliquota n° 3: sotto agitazione a 150 rpm con aggiunta di IgG anti-atrazina specifiche immobilizzate su tessuto di nylon nel rapporto molare 2 moli di IgG : 1 mole di contaminante.

Come in tutti gli altri esperimenti, le strisce di nylon attivate con IgG sono state risospese nel liquido da decontaminare con l'ausilio di palline di plastica cave, per mantenerle in sospensione, e dei piccoli piombi applicati all'altra estremità, per mantenerle distese durante l'agitazione.



Gli esperimenti di decontaminazione sono stati tutti condotti a temperatura ambiente.

Dopo 2 e 4 ore, da ciascuna aliquota di succo sono stati prelevati 100 ml su cui è stato determinato il contenuto di contaminante ancora presente nel liquido (atrazina non sequestrata - libera).

Nella tabella successiva vengono riportati i risultati ottenuti nelle suddette condizioni sperimentali ed espressi come abbattimento percentuale della concentrazione di atrazina libera nel succo di frutta (capacità decontaminante a mezzo IgG specifiche).

Metodo	Rapporto molare IgG: atrazina	Abbattimento % atrazina ai tempi:	
		2 ore	4 ore
IgG su palline vetro	2:1	45	60
IgG su nylon	1:1	65	78
IgG su nylon	2:1	87	95

Questi risultati indicano che la decontaminazione è possibile anche su liquidi edibili "densi" cioè in presenza di condizioni particolari del mezzo di reazione anticorpo / sostanza da eliminare.

Indicano, inoltre, che l'impiego nel procedimento di decontaminazione di tessuti, come mezzo di immobilizzazione degli anticorpi, rende significativamente migliorate le condizioni di reazione e quindi la capacità decontaminante stessa.

## RIVENDICAZIONI

1. Membrana per la decontaminazione di liquidi alimentari da contaminanti chimici e/o biologici caratterizzata dal fatto di essere costituita da materiale biocompatibile e di presentare legati covalentemente alla sua superficie anticorpi specifici per detti contaminanti.
2. Membrana secondo la rivendicazione 1 in cui in cui detti contaminanti sono scelti tra antiparassitari, diserbanti, pesticidi, farmaci e loro metaboliti, ormoni e loro metaboliti, prodotti della fermentazione malolattica del vino e tossine.
3. Membrana secondo la rivendicazione 2 in cui detti contaminanti sono scelti tra atrazina, aflatossina, ocratossina, fumonisina, cadaverina, putresceina, uretano, progesterone e antigene della Salmonella.
4. Membrana secondo le rivendicazioni da 1 a 3 in cui detto materiale biocompatibile è un polimero biocompatibile adatto ad essere coniugato covalentemente ad anticorpi.
5. Membrana secondo la rivendicazione 4 in cui detto polimero biocompatibile è in forma di tessuto o tessuto non tessuto.
6. Membrana secondo le rivendicazioni 4 o 5 in cui detto polimero biocompatibile è un polimero sintetico o semisintetico.
7. Procedimento secondo la rivendicazione 6 in cui detto polimero biocompatibile è scelto tra nylon e suoi derivati, derivati della cellulosa e poliacrilati.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7 in cui detto polimero biocompatibile è il nylon 6/6.

9. Membrana secondo la rivendicazione 7 in cui detto polimero biocompatibile è la nitrocellulosa.
10. Membrana secondo le rivendicazioni da 1 a 9 in cui il legame all'anticorpo avviene attraverso un linker.
11. Membrana secondo la rivendicazione 10 in cui detto linker è  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{N}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{O}$ .
12. Membrana secondo le rivendicazioni da 1 a 11 in cui detti anticorpi sono anticorpi policlonali.
13. Procedimento per la decontaminazione di un liquido alimentare da uno o più contaminanti chimici e/o biologici comprendente il contatto di detto liquido con almeno una membrana secondo le rivendicazioni da 1 a 12.
14. Procedimento secondo la rivendicazione 13 in cui detti contaminanti sono scelti tra antiparassitari, diserbanti, pesticidi, farmaci e loro metaboliti, ormoni e loro metaboliti, prodotti della fermentazione malolattica del vino e tossine.
15. Membrana secondo la rivendicazione 14 in cui detti contaminanti sono scelti tra atrazina, aflatossina, ocratossina, fumonisina, cadaverina, putresceina, uretano, progesterone e antigene della Salmonella.
16. Procedimento secondo la rivendicazione da 13 a 15 in cui detto contatto avviene per immersione di detta/dette membrane nel liquido da decontaminare.
17. Procedimento secondo la rivendicazione 16 in cui detta/dette membrane vengono mantenute in immersione per un periodo di

tempo compreso tra 1 e 24 ore.

18.Procedimento secondo la rivendicazione 17 in cui detta/dette membrane vengono mantenute in immersione per un periodo di tempo compreso tra 1 e 6 ore.

19.Procedimento secondo la rivendicazione da 16 a 18 in cui detta/dette membrane vengono mantenute in immersione in assenza di agitazione.

20.Procedimento secondo le rivendicazioni da 13 a 19 in cui detto liquido alimentare è vino, latte, succo di frutta, succo di verdura, birra o acqua.

21.Procedimento secondo le rivendicazioni da 13 a 20 in cui la superficie totale della/delle membrane utilizzate per ogni contaminante è tale che il rapporto molare tra l'anticorpo immobilizzato ed il contaminante verso cui l'anticorpo è diretto è  $\geq 1$ .



22.Procedimento secondo la rivendicazione 21 in cui detto rapporto molare è compreso tra 1 e 5.

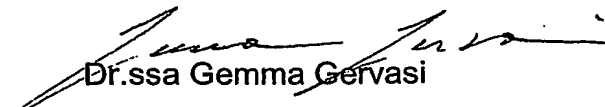
23.Procedimento secondo la rivendicazione 22 in cui detto rapporto molare è compreso tra 1 e 2.

(MAU/lm)

Milano 7 Giugno 2002

p. DOX-AL ITALIA S.p.A.

Il Mandatario

  
Dr.ssa Gemma Gervasi  
NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

